43—47

动 物 学 研 究 1995, 16 (1): 43—47 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

表皮生长因子对恒河猴创伤眼角膜的促恢复作用

陈云鹤 李靖炎
(中国科学院昆明动物研究所 650223)

A

摘要 本实验用5只恒河猴人工造成眼角膜创伤，基本一致地除去双眼角膜上皮细胞层，仅边缘部分残留有少量的角膜细胞。均以猴的右眼作实验处理，每日滴3次表皮生长因子(EGF)溶液(生理盐水配制，浓度130 μg/ml)；均以猴的左眼作对照，每日仅滴3次生理盐水。每日用荧光素钠溶液滴眼，检查眼角膜创面的恢复进展情况。结果实验眼的创面在第3—4天完全恢复，对照眼则在第5—6天恢复，实验眼比对照眼约提前2—3天恢复，表明表皮生长因子对恒河猴创伤眼角膜的恢复具有明显的促进作用。

关键词 表皮生长因子，眼角膜，恒河猴 实验动物

表皮生长因子(EGF)是具有多种生物学效应的多肽，由53个氨基酸组成，分子量为6054道尔顿。最初由Cohen等(1962)所发现，在性成熟的雄性小鼠颌下腺中其含量丰富。后来，在孕妇的血液(Ances，1973)及尿(Cohen，1975)中也发现有EGF，其生理、生化和抗原性质与小鼠的EGF极为相似。现在Sigma公司已有基因重组的产品销售。中国医学科学院基础医学研究所亦采用基因重组技术获得了EGF，并初步临床证明对烧伤治疗有较好的疗效(姜源，1991)。据王晋海等(1991)报道，应用高浓度的EGF对体外培养的鼻咽癌上皮细胞有抑制作用。川靖史等(1990)的研究认为EGF对胃手术切口有促进愈合作用。Tisutsumi等(1986)的研究则发现对减数分裂相的精子发生有刺激作用。因此，随着对EGF各种生物学性能的进一步研究，必将增加其临床用途和价值。

本实验是基于我们和别的作者曾做过表皮生长因子对组织培养的眼角膜和大鼠创伤眼角膜具有明显的促生长作用(Savage，1973；李靖炎等，1977)的基础上，为在临床上有可能应用于眼角膜创伤、角膜移植或其他角膜性眼疾的治疗，因此选用更接近于人类的恒河猴，人为地造成眼角膜创伤，用EGF进行了治疗试验。

1 材料和方法

1.1 实验动物

为云南产的5只恒河猴(*Macaca mulatta*)，3♀♀，2♂♂，年龄2—3岁，体重2.1—3.4 kg，均健康正常。在试验期间，每只猴单独饲养于1 m^3的铁丝笼内。

本文1994年1月28日收到，同年5月3日修回

1.2 表皮生长因子

参照 Cohen(1962)的方法，用昆明品系小白鼠(性成熟，雄性)颌下腺进行粗提取。100只鼠取得颌下腺湿重 16 g，按 1∶9(W／W)加 9 倍蒸馏水后在 4℃下匀浆。匀浆物在 16000 r／min 4℃下离心 10 min (以后的离心条件与此相同)。取出上清液后加入 1／9 体积的硫酸链霉素水溶液 (浓度为 5%，1 N NaOH 调 pH 至 9)，混合后的最终 pH 为 6.8—7.1。置于 0—4℃下过夜。次日混合液进行离心，取出粉红色的上清液，按每 ml 上清液加入 0.75 g 固体硫酸铵，混匀后在 0℃下停留 30 min，然后离心。弃去上清液，沉淀混悬于 10 ml 蒸馏水，用三角小瓶在沸腾的水浴中煮沸 5 min，再离心。上清液装入透析袋对蒸馏水透析(在 4℃下，约 2 h 换一次水，每次换 1000 ml，总共换 10 次)。经透析后的溶液无菌分装入小瓶，置 4℃下保存。测得的蛋白浓度为 1.3 mg／ml。这一提取物经用鸡胚眼角膜组织培养方法作生物活性检查，显示明显的刺激角膜上皮细胞增殖作用。

1.3 荧光素钠溶液的配制

取分析纯荧光素 400 mg 溶于 5%碳酸钠水溶液 20 ml 中，然后用浓盐酸调 pH 至 7.5，经煮沸消毒后置冰箱中备用。

1.4 猴眼角膜创伤方法

先用戊巴比妥钠溶液(5%)按 30 mg／kg 体重作静脉注射麻醉猴子。然后用浸湿生理盐水的棉签在眼球角膜表面上不断地旋转擦磨，随时滴加荧光素钠溶液，并用生理盐水冲洗，以检查角膜的损伤程度。角膜已造成损伤，上皮细胞被除去的部分就呈现蓝绿色荧光，未被损伤的部分则无荧光。用棉签磨擦每只猴的双眼，都造成直径约 9 mm 的创面，仅仅与巩膜连接的边缘部分留有少量角膜上皮细胞，角膜创伤术即完成。这时用含青霉素和链霉素(各 200 IU／ml)的生理盐水冲洗一次后，开始实验处理。

1.5 实验治疗处理

每只猴的右眼作实验处理，用 EGF 溶液(以生理盐水配成 130 μg／ml)滴眼，每日 3 次，每次 2 滴，直至角膜创面完全消失而恢复为止；以每只猴的左眼作对照处理，每日 3 次仅以生理盐水滴眼。每日定时用荧光素钠溶液滴眼检查角膜创面恢复进展情况，根据荧光有无，检查结果及时予以描绘记录。

2 结果与讨论

5 只实验猴的双眼在角膜创伤术完成时，荧光素钠溶液滴眼检查，证明眼角膜上皮细胞层基本被磨除，但与巩膜连接的边缘部分仍留有不到 1 mm 宽的少量角膜。这部分残留角膜的上皮细胞是眼角膜创伤重新增殖再生的基础。眼角膜创伤早期(头两天)，创伤周围的巩膜呈现轻微的充血，眼睑红肿，并有眼泪流淌。视力很差，用手在其眼前晃动时，猴不能迅速作逃避反应，但随着角膜的恢复视力逐渐得到改善。EGF 治疗处理后，眼角膜创面重新愈合恢复的结果，按每日检查情况分述如下，并把每只猴创伤眼角膜的进展描绘成图 1。

第 1 天(治疗处理达 24 h)荧光素钠溶液滴眼检查，治疗处理的实验眼和对照眼的角膜创面都没有显现再生或恢复，创面大小与造成的创面当日基本一样。

第 2 天荧光素钠溶液滴眼检查，所有治疗处理的右眼和对照的左眼，都出现了不同程度的再生与恢复，但 EGF 治疗处理的右眼比对照的左眼再生恢复更快，恢复的创面约超

过总创面的 2／3，而对照眼的创面则仅恢复总创面的 1／4。角膜的再生恢复都是从创面外缘向内发生的，新生长出的角膜有的离边缘处较远，有的则较近，这可能与角膜造成损伤时边缘部位残留的角膜上皮细胞数量的多少有关。

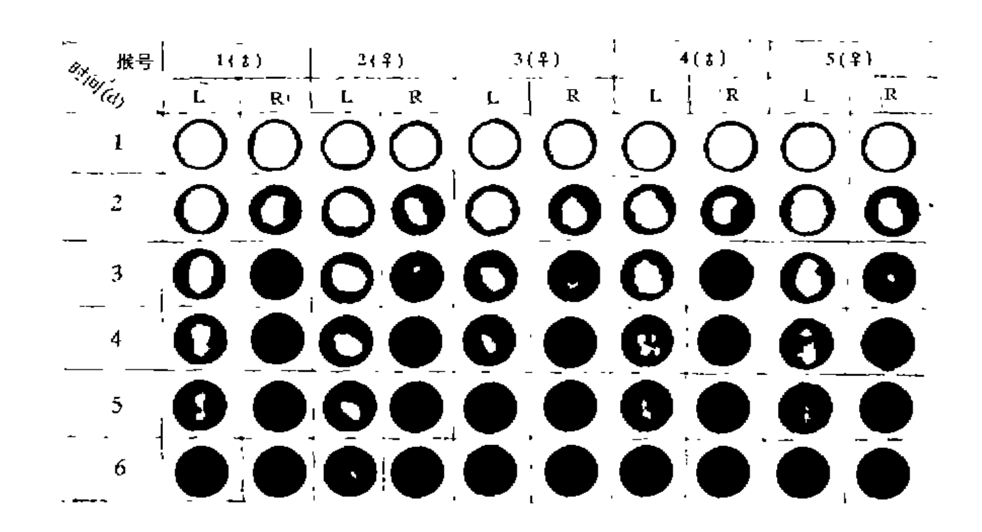


图 1 EGF 对恒河猴人工创伤眼角膜再生恢复的影响

Fig. 1　The effect of EGF on the reproducibility of artificially wounded cornea epiderm in rhesus monkeys

图中圆面内的白色部分显示人工除去眼角膜上皮的创面，黑色部分示角膜上皮。

角膜再生恢复进展说明见文中叙述

L：左眼　　R：右眼

The figure showed the artificially wounded commeasl (whithın area wıthın circles) and the gradually regenerated corneas (bıaek area within circles)　The details were stated in the contert

L：Left eye　　R：Rıght eye

第 3 天荧光素钠溶液滴眼检查，1 号和 4 号猴治疗处理的右眼创面已完全再生恢复，荧光素钠滴眼不再着色，其余的 2、3 和 5 号猴治疗处理的右眼，角膜再生也较快，仅剩约 1—2 mm^2 斑点状的创面，已临近完全恢复。作对照的左眼则 5 只猴都还有 1／2—1／4 左右的创面没有恢复。

第 4 天荧光素钠滴眼检查，作治疗处理的 5 只猴的右眼角膜创面全都恢复。作对照的左眼创面则尚无一只完全恢复，除 3 号猴左眼创面比较小(约 5 mm^2)外，其余 4 只猴还有 1／4—1／6 的创面没有恢复，其中 4 号和 5 号猴的左眼创面变成大小不同的 2 片或 4 片。

第5天荧光素钠溶液滴眼检查，3号猴的对照左眼已恢复，其余4只猴左眼创面仍未完全恢复，但创面已大为缩小，分别仅剩3—6 mm^{2}的小创面。

第6天荧光素钠溶液滴眼检查，1、3、4和5号猴的左眼创面都完全恢复，2号猴的左眼创面则还有1.5 mm^{2}的小创面未恢复。4 h后再作检查，创面已基本消失而达到恢复。

在5只猴的实验中，用EGF治疗处理的右眼创面在治疗的第3天(1及4号猴)和第4天(2、3及5号猴)完全恢复；对照的左眼创面，3号猴在第5天恢复，其余4只猴则在第6天恢复。实验眼比对照眼提前恢复约2—3天。这一结果表明由小鼠颌下腺提取的EGF对灵长类动物创伤眼角膜的再生恢复具有明显的促进作用。从而表明表皮生长因子应用于临床，将能明显促进眼角膜创伤治疗和角膜移植手术后的恢复。

EGF对许多上皮细胞具有正常的调节增殖作用，也能对一些恶性病变(如肿瘤)的上皮细胞有刺激增殖作用，故用于体内应谨慎。因EGF对眼角膜创伤等眼疾的治疗是以外用滴眼方式给药的，且每次用量很微(仅5—6 μg)，加之角膜上皮细胞对EGF的亲和作用比其他任何组织和细胞都强(Frati，1972)，因此EGF对眼角膜疾病的外用滴眼治疗相对来说，是很安全的。

参 考 文 献

李培炎等，1977．表皮生长因子对大鼠创伤眼角膜恢复作用的影响．科研工作汇编，(7)：74—76．

姜疆等编，1991．现代生物技术与医药．北京：科学普及出版社，74．

王菁海等，1991．上皮生长因子抗人鼻咽癌CNE和CNE-22增殖效应的研究．癌症，**10**(4)：296—298．

川靖史等，1990．表皮生长因子可促进胃手术切口的愈合．国外医学，第20期，封底

Ances I G，1973．Serum concentrations of epidermal growth factor in human pregnancy. *Am J. Obstet. Gymnecol.*, **115**: 357

Cohen S，1962．Isolation of a mouse submarxillary gland proein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, **273**: 1555-1562.

Cohen S *et al*，1975. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties *Proc Natl. Acad. Sci USA*, **72**: 1317-1321.

Frati L *et al*，1972. Selective bining of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. *Exp. Eve. Res.*, **4**: 135-141.

Savage C R *et al*，1973 Proliferation of cornea epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp. Eye. Res.*, **15**: 361-366

Starkey R H *et al*，1975. Epidermal growth factor: identification of a new hormone in human urine. *Science*, **189**: 800-802.

Tsutsumi *et al*，1986 A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science*, **233**: 975-977.

THE EFFECT OF EGF ON THE REGENERATION OF ARTIFICIALLY WOUNDED CORNEA EPIDERM IN RHESUS MONKEYS

Chen Yunhe　　Li Jingyan

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences* 650223)

Abstract

The effects of epidermal growth factor (EGF) on the regeneration of artificially wounded cornea epiderm were tested in 5 monkeys (*Macaca mulatta*, aged 2–3 years). The wounded right eyes of the experimental monkeys were treated with EGF(130 μg / ml) extracted from the submaxillary gland of male mouse, one drop per each eye, 4 times one day, while the wounded left eyes of the same monkeys were treated with axenic solution of 0.9% NaCl (control). The results showed that the wounded cornea of the right eyes were recovered in 3–4 days while that of the left eyes were recovered in 5–6 days. The recovery of the right eyes were faster than that of the left eyes. It suggested that the EGF from mouse submaxillary gland can be used for healing wounded cornea.

Key words　EGF, Wounded cornea, *Macaca mulatta*